## JP58149645

**Publication Title:** 

PREPARATION OF GELATINIZED MATERIAL

Abstract:

Abstract of JP58149645

PURPOSE:To obtain a gelatinized material, by adding transglutaminase to a protein-cotaining solution. CONSTITUTION:Both vegetable protein such as defatted soybean, etc. and animal protein such as milk protein, gelatin, collagen etc. can be used. When 1 unit transglutaminase based on 1g protein is added to a solution containing 2-15wt% protein, and, if necessary, a polysaccharide, seasoning, coloring matter, etc., the solution is gelatinized in a short time, to give a gelatinized material stable to heat. Transglutaminase forming crosslinking by covalent bonds between the residues of glutamin and lysine, extracted from the liver of a guinea pig is used as the transglutaminase. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of http://v3.espacenet.com

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

## (19. 日本国特許庁 (JP)

## ①特許出願公開

# ⑩公開特許公報(A)

昭58—149645

⑤ Int. Cl.³A 23 J 3/00

識別記号

庁内整理番号 7915—4B 砂公開 昭和58年(1983)9月6日

発明の数 1 審査請求 未請求

(全 7 頁)

# 匈ゲル化物の製造法

②特 ...

願 昭57—31978

@出

顏 昭57(1982)3月1日

@発 明

者 本木正雄

横浜市金沢区釜利谷町1915-59

⑩発 明 者 丹尾式希

川崎市川崎区観音2-20-8

切発 明 者 滝波弘一

横浜市港北区篠原台町3-16-

310

⑪出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8

号

明 細 書

1 発明の名称 ゲル化物の製造法

2 特許請求の範囲

蛋白質濃度2重量が以上の蛋白含有溶液に、 トランスグルタミナーゼを蛋白19に対して1 ユニット以上、添加してゲル化させることを特 酸とするゲル化物の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。
既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能
特性が乏しいの理由から利用が制限されれにの
動化食品であるなる。
を発生を改賞する技術が確立される品質を発生をなりまするだけでなった。
の食品を作りまるだけが変が、高品して解するが、現場ではかからの
のない。
の食品を作りまるが、現状では加水分解
のない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるトランスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量の多いグルタミン(Gin と略す)残基とリジン(Lys と略す)残基間に架橋を形成させ、ゲル状物質を製造できることを発見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は蛋白質濃度2重量が以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白19に対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質を出しては治療を呼びることができる。より分離した蛋白質を学げることができる。

これらの蛋白質の2重量多以上の蛋白含有溶液を開製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いことが望ましく通常2重量多以上、好ましくは5重

量がないし15度量がであればよい。この場合、 設物、多糖類、関味料、着色料、香辛料などの食品添加物を配合することができる。これらの使用量は、後のトランスグルタミナーゼによるゲル化を阻害しない範囲で適宜選択して添加すればよい。 蛋白溶液の濃度が2度量がより少ない場合には、 溶液状態のまま、もしくは沈酸を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液のpHは6ないし9であれば好ましい。

この蛋白含有溶液にトランスグルタミナーゼを 蛋白19に対して1ユニット以上添加してゲル化 させる。このトランスグルタミナーゼは Connellan らの方法 ( Journal of Biological Chemistry, 246(4), 1093(1971) ) に従 つて、モルモットの肝臓より調製される。即ち、 モルモットの肝臓をショ糖溶液に分散させたもの を遠心分離し、上清液を回収し、これにジエチル アミノエチルセルロースカラムにて分画すること によつて、粗製トランスグルコシダーゼを得る。 これを19硫酸プロタミンで沈澱させ、沈澱物を

の・0 1 Mとなるよう 
酸ナトリウムを加え、酢酸にてpH 5.0 に調整し、 
遠心分離する。得られた沈澱に 0・0 5 M リン酸級 
衝液 (pH 6.5) 3 0 配添加しホモゲナイズする。 
この懸濁液を違心分離し、その上清を 0・0 0 1 M 
リン酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、これ 
を租トランスグルタミナーゼ溶液として用いる方 
法である。

これらの方法は、操作順序を変化させたり、添加量、濃度、pH値分離装置などを若干変えても差しつかえない。このようにして得たトランスグルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法〔Journal of Biological Chemistry, 193, 265 (1951))で、酵素活性をNーカルボベンゾキシーレーグルタミニルグリシンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキサム酸法〔Journal of Biological Chemistry, 241(23), 6518 (1966)〕で測定すれば、開製した酵素溶液の比活性は6.0ないし13.0の範囲の値を示す。また、電気泳動によつて分子量を測定すると8.0万

回収する。さらにこの沈澱物を 0.2 M Tris 一郎 酸級 新液で洗浄後、 0.0 5 M 硫安 - 5 mM Tris - HC I級 衝液(2 mM エチレンジフミン 4 酢酸(以下 E D T A と略す)を含む)を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸 アンモニウム溶液(1 M E D T A を含む)を添加し遠心分離を行ない、沈澱物を回収する。沈澱物を 1 0 mM Tris - 酢酸級 衝液(1 mM E D T A 、 0.1 6 M KCIを含む)で溶解し、遠心分離した上清液を 1 0 多 ア ガロース( Bio Ge1 A - 0.5 M )でゲル濾過し、得製されたトランスグルタミナーゼを得る。

他のトランスグルタミナーゼの調製法としては、Clarke らの方法 (Archives of Biochemistry and Biophysics, 79, 338(1969))がある。即ち、モルモツト肝300Pに、0.25Mショ糖溶液 600配を加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

ないし9.0万の範囲の値である。このトランスグルタミナーゼ裕被は-30℃程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスグルタミナーゼを蛋白19に対して1ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が1ユニットより少ない場合には、高粘性の溶液となる。また、2000ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスグルタミナーゼで蛋白分子に Glu ー
Lys 架橋が生じることは知られている (J. E. Folk
and J. S. Finlayson "Advances in Protects
Che stry, "Vol. 31 ed. C. B.
Mi
Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards,
Academic Pres Ing., New York, N. Y., 1977,
p. 1.)が、高い蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルが Glu ー
Lys 架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスグルタミナーゼの反応部位となる

Lys 残基をアセチル化及びサクシニル化した asl カゼインにトランスグルタミナーゼを作 用させてもゲル化しなかつた。

- ② 反応溶液中に、S-S還元剤であるジチオス レイトールを共存させて反応を行なわせてい るので、S-S結合を主体とするゲルではない。

によるゲルは、そのままであるが通常のゼラ チンゲルは溶融した。

以上より、Glu - Lys 架橋によつてゲルが生成されており、S - S の架橋によるゲルではないと考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内にてゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白質と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度 のより強いゲルを作ることができる。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様 にヨーグルト、セリーなどとして用いることはも ちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであ るため、マイクロカブセルの案材、固定化酵素の 素材などとしても用いることができるものである。

#### 奥施例 1

以下の方法によりトランスグルタミナーゼを調製した。モルモツト肝 8 0 0 g に冷 0.2 5 M ショ糖溶液約 2 化加え、 2 0 0 0 0 rpm、 2 分でホモゲイズし、遠心分離(105,000×9、5 ℃、1時間)を行ない上滑を得た。

これを 5 mM・トリス・塩酸緩衝液(2 mM EDTA 含有、 pH 7.5 )で平衡化してある DEAE セルロールカラムに添加・吸着させた後、 上記緩衝液の食塩濃度を 0 Mから 1.0 Mまで変化 させる勾配溶離法で分画し、酵素活性の高い画分 を得た。

これをゆつくりと提拌しながら1 多硫酸プロタミン40 mlを添加し、遠心分離(1 4.600×9、15分、5 ℃)で沈澱を集め、これを0.2 M トリス・酢酸酸衝液(pH 6.0) に懸濁、ホモゲイズして洗い、遠心分離(2.600×9、1分、5 ℃)で、沈澱を集めた。

この沈毅より、 0.0 5 M 硫安を含む 5 m M トリス塩酸緩衝液 ( 2 m M E D T A 含有、 p H 7.5 )

を添加し、ホモゲイズすることによつて、トランスグルタミナーゼを抽出した。これを3度繰り返し、集めた抽出液を5mMトリス・コハク酸緩衝液(2mM EDTA合有、pH 6.0)で平衡化したカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、プロタミンを除去し、灌液に1M EDTA(pH 8.0)2.4 mlと硫安 47.4 gを加え、よく攪拌した後に、遠心分離(15,000×g、10分、5 で沈澱を集めた。

これを10mMトリス・酢酸級衝液(1mM EDTA 0.1 6 M KCl 含有、pH 6.0)に溶解 し、遠心分離(27,000×9、30分、5℃) で難容物を除いた後、上滑を同じ緩衝液で平衡化 している10ダアガロース(Bio Gcl A - 0.5 M) でゲルな過を行ない、活性の高い画分を集め、これを10~20町/配の機度となるよう限外離 (UM-10、アミコン社製)で濃縮し、トラン スグルタミナーゼ溶液とした。この溶液を一30 で以下で凍結保存し、適時溶解し使用した(尚、 これは常時5℃で操作し調製した。)。 表1に示した基質蛋白にトタンスグルタミナー せを作用させ、ゲル化物を得た。

**旁** 1

	洞	整	法	4	N	化
牛乳蛋白 ① asl ーカ ゼイン	カゼインを 2ittle 6.6 M尿 加えて4.8 生じる と が A NaCH 格 7.2 とする ニウムーエ	4.8 にの方に変化した。 クロのでは、 の方に変化したれーで動に対け、 の方に変化したれーで動に対した。 という はいい はいい はいい はいい はいい はいい はいい はいい はいい は	とよどしたで、酸のれ生した はないすりである。 はないすりである。 はないでは、酸のなりでは、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 ができるが、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 は、 ができるが、 は、 ができるが、 は、 は、 ができるが、 は、 は、 ができるが、 は、 は、 は、 は、 ができるが、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は	ト (2 0 ml ト を こ ス 白 1 切 ト な こ ス 白 1 切 ト な こ ス 白 1 切	一塩間 CaC Mark Cac Ma	1g、 レス 1 5 サンス 1
牛乳蛋白 ②Na -カゼ イネート	_	New Zea		得た。 多の濃 ルタミ	且し、 度でトゥ ナーセッ して 0・	てが加金10重量ランス白109年109年1

基質蛋白	<b>34</b>	整	法	У	ル	化
1150	温抽出脱版 素料製 )」 一生 か か で お 6.4 に 禁 と し、 p H 7	大り破り出し、 豆、(ーし遠原と後、 は、のない。 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、 は、	出液をpH 離によつて 衝液にとか 遠心分離し 結乾燥して	(2)に同じ		
	低温抽出 の素料製 スー塩酸 カーカー カート カート カート カート カート カート カース カーカー カース カーカー カース カース カース カース カース カ	加よ衡エで開除との透大り液を抽製きしの析豆、(ノ出、、、に後、このでは、、、に後、このでは、、、に後、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは	抽出液を 心分離によ られる上澄 成する沈殿 散してpH 凍結乾燥し	②に同じ		
⑤分離状大 豆蛋白	「アジプロ (株製)	ンミー2	」(味の素	②に同じ		

基質蛋白	詞	整	法	4	n	化
⑥水柏出大 豆蛋白	低温抽出脱の素料製) 遠心分離後 乾燥し、水	を水に懸	<b>剛慢</b> 押し、 透析、凍結	② に同じ	·	
	低原料(数) 生物(数) 生物(	を 0.03 ( 10 m ノール 機を 上海 上海 に を し に 液 に 液 に し に 液 に し に た し に た に た し に た る に る に る に る に る に る た る に る に る た る し に る た る し と る し と 。 と る と し と 。 と の と し と 。 と と と と と と と と と と と と と と と と	Mトリスー M2ーメル 有、pH し、違心分 と に た た に た に た に た に た た に た た に た た た に た た に た	② <b>た</b> 同じ		
(8)大豆蛋白 粒子	丸大豆を水 後、ホモゲ 確遇(20 離して蛋白 56-68	ナイザー 0 me sh 粒子とし	で粉砕し、)し遠心分た(特別昭	<b>②</b> に同じ		
9大豆蛋白 ミセル	(特公昭 5 方法)	6 - 3 1	095号の	②に同じ		

基質蛋白	調	整	法	か ル 化
<b>(</b> 0セラチン	メルク社製			10重量が終となる ように 0.1 M 5 m M 7 m M 7

※1 C. A. Zittle et al. J. Dlary Sci., 46, 1183(1963)

### 実施例 2

 a sln セイン、Na - カゼイネート、大豆蛋白

 1 1 S グロブリン、水抽出大豆蛋白、各々5 0 0

 ng を 0.1 M トリス塩酸緩衝液(5 m M CaCl<sub>2</sub> 、

 2 0 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6 )

表 2

3.5 叫に俗解し、これに大豆油 1.5 叫を加えて20000 rpmで3分間ホモゲナイズして乳化物を得た。これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 切に対して0.0 g ユニット加えると即座にゲル化物を得た。

#### 実施例3

 $a_{81}$  - カゼイン、大豆蛋白 1 1 S グロブリン及び大豆蛋白 7 S グロブリンの 2 , 5 , 1 0 重量 5溶液を 0.1 Mトリス・塩酸緩衝液 (5 mM CaCl<sub>1</sub>)、2 0 mM ジチオスレイトール含有 pH 7.6 )で0.5 配作成し、3 7 でで各々にトランスグルタミナーゼを蛋白 1 写に対して 0.1 ユニットの割合で加えて、ゲル化するか否を判定し、表 2 の結果を得た。

**接** 

日 白	5×10 <sup>-4</sup>	1×10	0.01	0.05	1.0	2.0
5 重量 第 α <sub>81</sub> カゼイン	Δ	0	0	0	<b>@</b> ·	0
10重量が 115グロブリン	×	×	0	0	0	0

◎:即座にケル化した

〇:1時間以上にゲル化

△:ゲルするが弱いゲル

×:溶液のまま

#### 実施例 5

5 mM Call, と 2 0 mM ジチオスレイトールを 含んだ p H 7.0 ~ p H 9.0 のトリスー塩酸緩衝液 を調整し、それを用いて、 5 重量 5 α s1 カゼイン 溶液と 1 0 重量 5 大豆蛋白 1 1 S グロブリン溶液 を各 0.8 ml ずつ作成し、トランスグルタミナーゼを蛋白 1 写に対して 0.1 ユニット添加してゲル化 するか否かを観察した。結果を表 4 に示す。

番 自 基質濃度	2.0 %	5.0 %	1 0.0 %
α 81 カゼイン・・	Δ	0	0
大豆蛋白118グロブリン	×	Δ	0
大豆蛋白 7 S グロブリン	×	×	0

〇: ゲル化

△:弱いゲル

×:溶液のまま

#### 実施例 4

a81カゼインの5重量多溶液と大豆蛋白11Sグロブリンの10重量多溶液を0.1 Mトリスー塩酸緩衝液(5 mM CaClg、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)で調整し、これら溶液0.8 配に対して、トランスグルタミナーゼを蛋白1 町あたり5×10<sup>-4</sup>~2.0 ユニット添加してゲル化するか否かを観察したところ、表3に示すよりな結果を得た。

表 4

蛋白pH	7.0	7.5	.8.0	8.5	9.0
5 重量 β α <sub>5 ]</sub> カゼイン	0	0	0	· <b>③</b>	0
10重量第11.8グロブリン	0	0	0	×	×

◎:即座にゲル化

〇:ややゲル化に時間を要した

×:溶液のまま

#### 实施例6

直径 9.3 mm、高さ 1.5 mmのテストピース作成容器に試料溶液 1 mlを流し込み、下記に示す様にゲル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオログラム(東洋精機製作所㈱、CV-100)にて、18から 25 でまで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

#### ① ゼラチン冷却ゲル

10重量が溶液となるように、ゼラチンに水を加え、60℃、3分で完全にゼラチンを溶解

#### 特開昭58-149645 (6)

後、1 Mをテストピース作成容器に流し込み、 3 Cにて 2 0 分放置し、ゲル化させ室温に戻し て測定した。

#### 2 ゼラチンTGase ゲル

ゼラチンに10重量が溶液となるように 0.1
Mトリス塩酸溶液(5 mM CaCl<sub>8</sub>、 2 0 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)を加え、6 0 で、3 分で完全にゼラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスグルタミナーゼをゼラチン1 町に対して 0.1 ユニツトの割合で加え、室温に 1 時間放置しゲル化させ、測定した。

結果を図1に示す。セラチン冷却ゲルは温度が増加するとともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、それに比してセラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかつた。

#### 実施例7

 $\alpha_{sl}$ カゼインについては 5 重量が、大豆 1 1 S グロブリンについては 1 0 重量がとなるように

#### 4 図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、横軸は 温度(C)、縦軸は貯蔵弾性率(dyn/cd))であ り、実線は本発明のセラチンTGaseゲルを、破 線はセラチン冷却ゲルを示す。

特許出顧人 味の素株式会社

0.1 Mトリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl,、2 0 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)で1 m8 を関製し、これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 町に対して 0.1 ユニットを加えゲルを得た。このゲルを、さらに 1 0 0 でに 2 0 分間保つた後、室温まで冷却した。

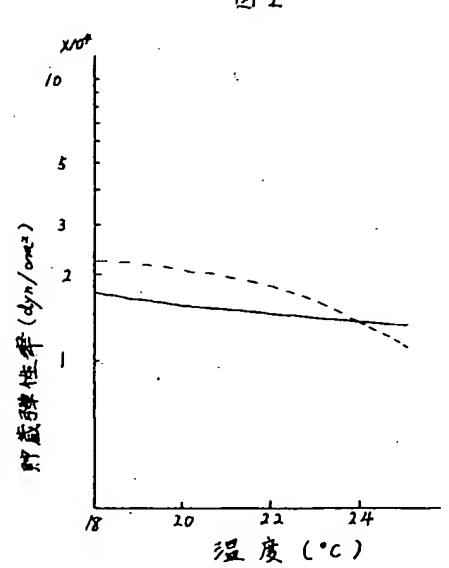
ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲル についてレオメーター(不動工業㈱、NRMー 2002])で、ブランシャー(5g、ボール型) を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度と した。結果を表5に示す。

麦

蛋白	未加熱	加熱処理後
5 重量 <b>5</b> α <sub>81</sub> ゲル	1 2.0 P	2 5.6 9
10重量が11.8ゲル	2.8 9	3 7.0 9

上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理 した方がゲル強度が増加した。

図1



#### 特開昭58-149645(プ)

#### 手鼓裤正書

昭和57年10月6日

#### 特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許顧31978号

2. 発明の名称

ゲル化物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

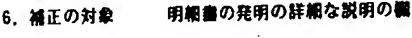
住 所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006)味の棄株式会社

代表者 取精役社長 歌田 勝弘

4. 補正命令の日付 自発

5. 補正により増加する発明の数 な



- 7. 補正の内容
- (1) 明細書第6頁第12行の「Protecn」を「Protein」に補正する。

- (2) 明報書第9頁第7行の「5m M・トリス」を「5m M トリス」に補正する。
  - (3) 明和書第10頁第14行の「GCI」を「Gel」に補正する。
- (4) 明朝書第11頁表1の牛乳蛋白②Na ーカゼイネートの器の 「化学解及び」を「化学例)及び」に補正する。
- (5) 明細書第11頁表 1 の牛乳蛋白②Na ーカゼイネートの欄の「Dacry」を「Dairy」に補正する。
- (6) 明細書第11頁表子の牛乳蛋白②Na ーカゼイネートの欄の「共器㈱))」を「共益㈱)」に補正する。
- (7) 明細智第12頁表1の大豆蛋白11Sグロブリンの欄の「クレーク」を「フレーク」に補正する。
- (8) 明桐書第16頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。
- (9) 明細書第17頁表3個外の「△:ゲルする」を「△:ゲル化 する」に補正する。
- (10) 明細書第17頁下から第7行の「Call<sub>2</sub>」を「Ca Cl<sub>2</sub>」に補正する。
- (11) 明樹幽第17頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。
- ・(12) 明和書第18頁下から第9行の「高さ1.5mm」を「高さ 15mm に補正する。

# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

# BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
□ OTHER: \_\_\_\_\_

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.